

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin
Direktor: Prof. Dr. med. Hans Herken

Untersuchung über die aerobe Glykolyse in Säugetier-Embryonen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von
Heidelind Weber geb. Peters
aus Großmergthal

1973



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543104_0002

Aus dem Pharmakologischen Institut
der Freien Universität Berlin

Direktor: Prof. Dr. med. Hans Herken

Untersuchung über die aerobe Glykolyse in Säugetier-Embryonen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Heidelind Weber geb. Peters

aus Großmergthal

Referent: Professor Dr.med. Diether Neubert

Korreferent: Professor Dr.med. Dr.rer.nat Heinz Tiedemann



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 5. 2. 1973

Inhaltsverzeichnis	Seite
I. Einleitung	6
II. Material und Methodik	8
1. Versuchstiere	8
1.1 Vorbereitung der Versuchstiere	8
1.2 Präparation der Rattenembryonen	9
2. Biochemische Methoden	9
2.1 Inkubationsmedium	9
2.2 Bestimmung von Laktat nach HOHORST	10
2.21 Testansatz	11
2.22 Meßbedingungen	11
2.23 Berechnung	12
2.3 DNA-Bestimmung nach BURTON	12
2.31 Testansatz	13
2.32 Messung	13
2.33 Berechnung	13
2.4 Herstellung von Rattenserum	14
III. Ergebnisse	14
1. Laktatgehalt der Rattenembryonen	14
1.1 Laktatgehalt vom Tag 11 bis Tag 14 der Schwangerschaft	14
1.2 Laktatgehalt bei verschiedenen tierstämmen	16

	Seite
2. Laktatbildung bei Rattenembryonen	20
2.1 Laktatbildung bei intakten Rattenembryonen vom Tag 11 bis Tag 14 der Schwangerschaft	20
2.2 Laktatbildung bei intakten Rattenembryonen bei veränderter Inkubationstemperatur	25
2.21 Laktatbildung bei intakten Rattenembryonen vom Stamm WISTAR SW 69 bei verschiedenen Inkubationstemperaturen	25
2.3 Laktatbildung bei intakten Rattenembryonen mit unterschiedlicher Glukosekonzentration	29
2.4 Laktatbildung bei intakten Rattenembryonen in Gegenwart von reinem Sauerstoff	33
3. Versuche mit Cyclophosphamid	38
3.1 Bestimmung des DNA-Gehaltes (13 Tage alte Embryonen)	38
3.2 Messung des Laktatgehaltes und der Laktatbildung	39
4. Versuche mit 6-Aminonicotinamid	44
4.1 Laktatgehalt bei Versuchen mit 6-AN	44
4.2 Laktatbildung bei Versuchen mit 6-AN	50
IV. Diskussion	60
1. Allgemeines	60
1.1 Laktatgehalt und Laktatbildung	61

	Seite
1.2 Einfluß der Glukosekonzentration auf die Glykolyse	64
1.3 Einfluß der Inkubationstemperatur	65
2. Einfluß einer Behandlung mit tera- togenen Substanzen	66
2.1 Cyclophosphamid (ENDOXAN)	66
2.2 6-Aminonicotinamid	66
V. Zusammenfassung	69
VI. Literaturverzeichnis	70

I. Einleitung.

Die Differenzierung und das schnelle Wachstum von Embryonen bis zur Geburt sind von großem wissenschaftlichen Interesse. So zeigt sich beim embryonalen Gewebe beispielsweise eine besonders hohe Syntheserate, bei der sich sofort die Frage erhebt, woher die Embryonen die dazu notwendige Energie nehmen. Neben der Atmung und der oxidativen Phosphorylierung steht zur Energiegewinnung auch die Glykolyse zur Verfügung. Sie stellt eine vielstufige Reaktionskette dar, in der Glukose in Pyruvat bzw. Laktat unter Energiegewinn umgewandelt wird.

WARBURG hat sich in den Jahren von 1922 bis 1928 sehr intensiv mit energieliefernden Reaktionen an normalen, embryonalen und malignen Zellen beschäftigt. Er kam nach vielen Versuchsreihen zu dem Schluß, daß alle normalen Gewebe, auch die der schnell wachsenden Embryonen, zu keiner aeroben Glykolyse befähigt sind. Die Tumorzellen dagegen sollen 40 - 50% ihrer benötigten Gesamtenergie durch die aerobe Glykolyse decken. WARBURG führte dies auf eine Störung der Atmung zurück.

In verschiedenen Versuchsreihen befaßte sich auch NEGELEIN (1925) mit der Glykolyse in embryonalem Gewebe. Er kam zu dem Schluß, daß Embryonen

in der Lage sind, unter anaeroben Bedingungen Laktat zu bilden, nicht aber unter aeroben.

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, inwieweit unversehrte Rattenembryonen in den unterschiedlichsten Entwicklungsstadien in vitro in der Lage sind, in Anwesenheit von Glukose und Sauerstoff Laktat zu bilden. Auch wurde der Frage nachgegangen, wie hoch der stationäre Laktatgehalt in den verschiedenen Stadien der Embryonalentwicklung ist.

Von Interesse war schließlich noch der Einfluß von Hemmstoffen auf die embryonale Glykolyse.

II. Material und Methodik.

1. Versuchstiere.

1.1 Vorbereitung der Versuchstiere.

In den Versuchen wurden 150 - 180 g schwere Albino-Ratten der Stämme WISTAR SW 64, SW 68 und SW 69 von der Fa. Winkelmann, Kirchborchen bei Paderborn, und der Fa. Spiegel, Hannover, sowie Albino-Ratten aus der DDR (Stamm ebenfalls WISTAR) verwendet.

Die Tiere wurden unter folgenden konstanten Bedingungen gehalten:

Raumtemperatur 25° Celsius
relative Luftfeuchtigkeit 60%
Tränkung mit Aqua ad libitum
Fütterung mit ALTROMIN R

Die Tiere wurden unter einem definierten Hell-Dunkel-Rhythmus gehalten. Der Zyklus einer Ratte beträgt 3 - 4 Tage, die Ovulation findet in der Regel - bei normalem Tag-Nacht-Rhythmus - nachts statt. Um die Ovulation in die Arbeitszeit fallen zu lassen, wurde der Rhythmus so verändert, daß von 12⁰⁰ bis 4⁰⁰ in den Ställen Licht brannte. Zur Paarung wurden die Männchen mit den Weibchen 4 Stunden vor dem Ende der Dunkelperiode für 2 Stunden im Verhältnis 1 : 3 zusammengesetzt. Anschließend wurde durch vaginalen Abstrich geprüft, ob ein Koitus stattgefunden hat. Sind Spermien

nachgewiesen, so ist mit 90 % damit zu rechnen, daß eine Befruchtung erfolgt. Der Hell-Dunkel-Rhythmus bringt den großen Vorteil, daß man den Zeitpunkt der Ovulation in die Tagstunden verlegen kann und außerdem jahreszeitlich bedingte Schwankungen völlig ausschalten kann.

Als Tag 0 der Schwangerschaft gilt der Tag vom Auffinden der Spermien bis zum folgenden Tag 9 Uhr.

1.2 Präparation der Rattenembryonen

Die Muttertiere wurden durch Dekapitation getötet, mit zwei lateralen Schnitten die Bauchhöhle eröffnet und die Uteri herauspräpariert. Die Befreiung der Embryonen von ihren Eihäuten erfolgte durch einen Sagittalschnitt. Blutreste wurden vorsichtig abgetupft. Damit waren die Embryonen vorbereitet für die Inkubation.

2. Biochemische Methoden

2.1 Inkubationsmedium

Als Inkubationsmedium für die Rattenembryonen wurden Rattenserum und Krebs-Ringer-Phosphat-Lösung mit verschiedenen Glukosekonzentrationen verwendet. Die Temperaturen lagen bei 25° und 37° Celsius, die Zeiten der Inkubation wurden variiert. Die Reaktion wurde mit kalter 6 %iger

HClO_4 (7.7 ml HClO_4 , Dichte = 1.67, mit Aqua dest. ad 150 ml) beendet. Anschließend wurde 15 Minuten lang bei 5000 Umdrehungen pro Minute in der Kühlzentrifuge zentrifugiert, der Bodensatz aufgehoben für die DNA-Bestimmung, der Überstand mit 5 μl Methylorange (50 mg Methylorange mit Aqua dest. ad 100 ml) versetzt und mit 5-molarer K_2CO_3 -Lösung (ca. 69 g K_2CO_3 mit Aqua dest. ad 100 ml lösen) neutralisiert. Vor der Messung im Eppendorf - Photometer nach der Methode von HOHORST (1962) wurde noch einmal 10 Minuten lang bei 5000 Umdrehungen pro Minute in der Kälte zentrifugiert und der Überstand zur Laktatbestimmung verwendet.

2.2 Bestimmung von Laktat nach HOHORST (1962)

Milchsäure kann, katalysiert durch Laktat-Dehydrogenase (LDH), in Anwesenheit von NAD^+ unter Freiwerden eines Wasserstoffions in Pyruvat und $\text{NADH} + \text{H}^+$ übergehen. Normalerweise liegt das Gleichgewicht weit auf der Seite von Laktat und NAD^+ . Das Gleichgewicht kann zugunsten von Pyruvat und NADH_2 verschoben werden, wenn NAD^+ und LDH im Überschuß bei alkalischem Milieu - pH 9.5 - hinzugegeben werden. Das während der Reaktion gebildete Pyruvat wird von Hydrazin abgefangen.

2.21 Testansatz

Hydrazin - Glycin - Puffer	0.45 ml
(7,5 g Glycin 5,2 g Hydrazin-Sulfat 0,2 g EDTA - $\text{Na}_2\text{H}_2 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ in etwas Aqua dest. suspendieren und 51 ml 2 N NaOH hinzugeben Aqua dest. ad 100 ml)	
NAD ⁺ - Lösung	0.05 ml
(40 mg mit Aqua dest. ad 1 ml)	
Versuchsextrakt	0.2 ml
Aqua dest.	0.3 ml

Vergleichsküvette

Hydrazin - Glycin - Puffer	0.45 ml
NAD ⁺ - Lösung	0.05 ml
Aqua dest.	0.5 ml

2.22 Meßbedingungen

Der Küvetteninhalt wurde gründlich gemischt, auf Raumtemperatur gebracht und Extinction E_1 abgelesen. Die Messung der Extinctionen erfolgte bei 366 nm im Eppendorf - Photometer gegen die Vergleichsküvette. Die Schichtdicke d war 1 cm-

Nach Messung von Extinction E_1 wurden 0.01 ml der LDH - Suspension (Boehringer - Enzymsuspen-

sion) hinzugegeben und 10 bis 20 Minuten später nach Reaktionsablauf die Extinction E_2 abgelesen.

2.23 Berechnung

Milchsäure wird quantitativ umgesetzt. Der Laktatgehalt des Untersuchungsmaterials läßt sich daher aus der Extinctionsdifferenz berechnen.

$$\frac{E \times \text{Verdünnung}}{\epsilon \times d} = \text{Mol L-(+) Laktat/DNA}$$

E = Extinctionsdifferenz $E_2 - E_1$

Verdg. = Gesamtverdünnung des Untersuchungsmaterials

ϵ = molarer Extinktionskoeffizient

d = Schichtdicke

2.3 DNA - Bestimmung nach BURTON (1956)

Das Sediment des Reaktionsansatzes nach Ausfällen mit Säure, das die DNA enthielt, wurde mit 0.8 ml einer 5 %igen HClO_4 versetzt und 15 Minuten im Wasserbad bei 75° Celsius extrahiert. Im Anschluß daran wurde 10 Minuten in der Kühlzentrifuge bei 5000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert, der Überstand dekantiert und zur DNA - Bestimmung verwendet.

2.31 Testansatz

Reagens: 3 g Diphenylamin
 0.01g Acetaldehyd
 2.64g Schwefelsäure 96 %ig
 Eisessig ad 100 ml

Reaktionsansatz:

Untersuchungslösung	1 ml
Reagens	2 ml

Vergleichssubstanz:

Kalbsthymus-DNA: 25 und 50 μ g

2.32 Messung

Das Reaktionsgemisch blieb bei Zimmertemperatur 20 Stunden stehen. Dann wurden im Beckman - DB - Photometer die Extinctionen der entstandenen Farbe bei den Wellenlängen 525, 595 und 625 nm gemessen.

2.33 Berechnung

Die Berechnung erfolgte nach folgender Formel:

$$2 \times E_{595} - (E_{525} + E_{625}) ,$$

um eine Korrektur für den "background" zu erhalten. Aus den Eichwerten wurde der Faktor berechnet, mit dem alle Extinctionsdifferenzen multipliziert wurden.

$$\frac{\text{Extinctionsdifferenz} \times \text{Faktor}}{100} = \mu\text{g DNA}$$

2.4 Herstellung von Rattenserum

Die Tiere wurden durch Dekapitation getötet und das Blut in Zentrifugenröhrchen aufgefangen. Der Blutkuchen wurde mit einem Glasstab vorsichtig vom Glasrand gelöst und in der Kühlzentrifuge bei 3000 Umdrehungen pro Minute 10

Minuten zentrifugiert. Das erhaltene Serum wurde 48 Stunden bei 4° Celsius gegen eine Krebs-Ringer-Phosphat-Lösung dialysiert, um Substrate zu entfernen, und dann als Inkubationsmedium verwendet.

III. Ergebnisse

=====

1. Laktatgehalt der Rattenembryonen

1.1 Laktatgehalt vom Tag 11 bis Tag 14 der Schwangerschaft

Der stationäre Laktatgehalt der Embryonen bezogen auf deren Gesamt-DNA-Gehalt spielt als Ausgangspunkt der Versuche eine große Rolle. Die Bestimmung des stationären Laktatgehalts erfolgte nach schnellem Herauspräparieren aus dem Muttertier und nach Ausschaltung aller enzymatischen Reaktionen durch Säure-Stop. Dabei zeigte sich, daß der Laktatgehalt abhängig ist vom Alter der Embryonen und von dem jeweilig verwendeten Stamm. Der stationäre Laktatgehalt ist am Tag 11 der Schwangerschaft besonders hoch und fällt innerhalb der nächsten 3 Tage, also bis zum Tag 14, auf fast ein Drittel ab.

Laktatgehalt von Rattenembryonen Tag 11 - 14

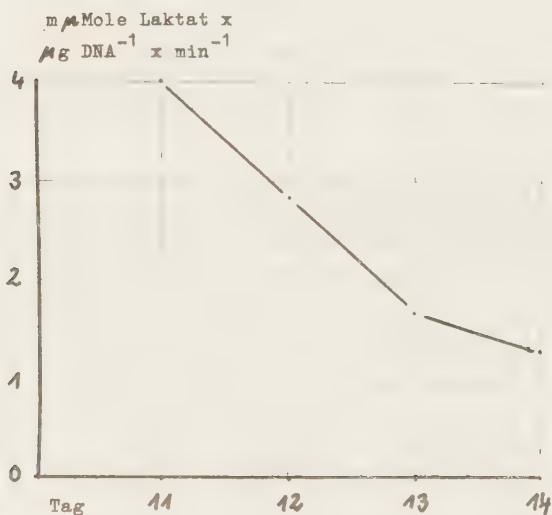


Abb. 1

Der stationäre Laktatgehalt ist vom Alter der Embryonen abhängig. Er ist am Tag 11 hoch und fällt innerhalb der nächsten Tage auf etwa ein Drittel ab.

Jeder Punkt = Mittelwert von 5 Bestimmungen
(Je 3 Embryonen Tag 11, je 1 Embryo Tag 12 - 14)

1.2 Laktatgehalt bei verschiedenen Tierstämmen

Bei den verwendeten Stämmen zeigten sich im Laktatgehalt gewisse Unterschiede. Bei einem WISTAR-Stamm aus der DDR fand sich vergleichsweise ein geringerer Laktatgehalt als bei den Tierstämmen WISTAR SW 64 und SW 68 aus Paderborn, die untereinander kaum Unterschiede aufwiesen. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in Tabelle I und II, sowie in Abb. 2 zusammengestellt.

Auffallend ist der Befund, daß beim Stamm SW 69 der Laktatgehaltsabfall vom Tag 11 zum Tag 12 geringer ist als bei früheren Versuchen mit anderen Tierstämmen.

Tabelle I

Tierstamm	Alter	Anzahl	Laktatgehalt in $\mu\text{Mole Laktat} \times \mu\text{g DNA}^{-1}$
WISTAR SW 64	11	3	4.2 5.5 5.1 5.3
WISTAR SW 68	11	3	4.5 3.3 5.3 2.7
			4.49 ± 1.03 (7.40875)
WISTAR SW 64	12	1	2.7 3.2 3.3
			3.076 ± 0.32 (0.20667)
WISTAR BDR	12	1	2.5 2.6
			2.55 ± 0.05 (0.0050)
WISTAR SW 64 WISTAR SW 68	13	1	1.9 1.6 1.6 1.8 1.7 1.6 1.5
			1.67 ± 0.138 (0.114285)
WISTAR SW 64	14	1	1.3
WISTAR DDR	14	1	0.9 1.4
			1.15 ± 0.354 (0.125)

Laktatgehalt bei Rattenembryonen vom Tag 11 - 14 der Schwangerschaft bei unterschiedlichen Tierstämmen

Tabelle II

Tierstamm	Alter	Anzahl	m μ Mole Laktat x μ g DNA ⁻¹
WISTAR SW 69	11	10	3.4 3.7 3.5 3.5 3.6 3.4 3.4 3.5 3.4
			3.49 $\pm$ 0.105 (0.0889889)
WISTAR SW 69	12	6	3.1 2.9 3.0 3.2 2.8 2.9 3.0 2.7 2.8 2.9 2.7 3.1 3.2 3.4 3.0
			2.98 $\pm$ 0.197 (0.544)

Stationärer Laktatgehalt bei Rattenembryonen vom Stamm WISTAR SW 69 am Tag 11 und 12 der Schwangerschaft.

Mittelwerte $\pm$ Standardabweichung.

Die in Klammern angegebenen Werte ($\sum x^2 - \bar{M} \cdot \sum x$) werden für die Signifikanzberechnung benötigt.

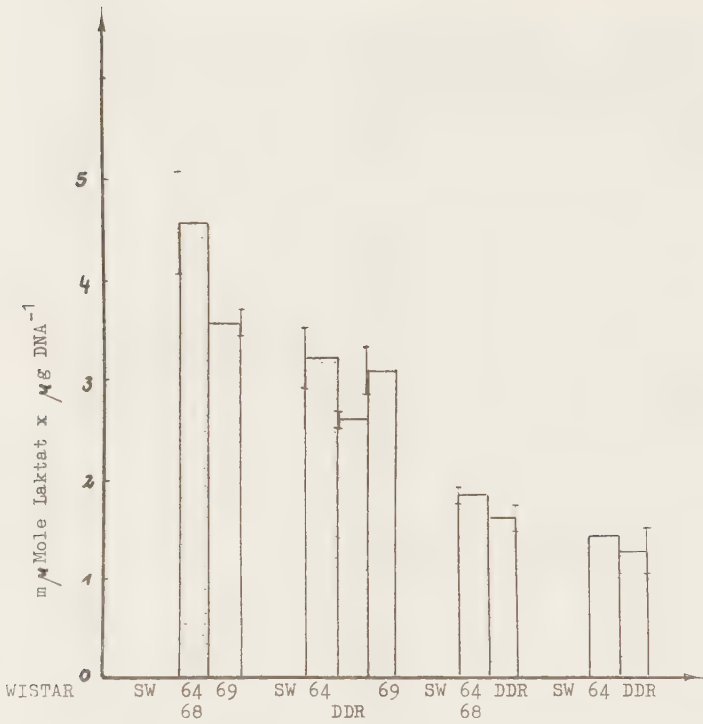


Abb. 2

Stationärer Laktatgehalt bei Rattenembryonen vom Tag 11 bis 14 der Schwangerschaft bei verschiedenen Tierstämmen

2. Laktatbildung bei Rattenembryonen

2.1 Laktatbildung bei intakten Rattenembryonen vom Tag 11 bis Tag 14 der Schwangerschaft

Die Bildung von Laktat in vitro wurde bei Embryonen vom Tag 11 bis Tag 14 der Schwangerschaft gemessen. Dabei konnte festgestellt werden, daß die Embryonen vom Tag 11 zu einer stärkeren Milchsäurebildung fähig sind als die Embryonen vom Tag 12 - Tag 14.

Am Tag 11 der Schwangerschaft beträgt die gebildete Milchsäuremenge bei 37° Celsius bei den WISTAR-Stämmen SW 64 und SW 68 ($\bar{M} \pm S.D.$) :

$$0.90 \pm 0.16 \text{ m}\mu\text{Mole Laktat} \times \mu\text{g DNA}^{-1} \times \text{min}^{-1}$$

Sie fällt am Tag 12 der Schwangerschaft unter gleichen Bedingungen auf

$$0.20 \pm 0.02 \text{ m}\mu\text{Mole Laktat} \times \mu\text{g DNA}^{-1} \times \text{min}^{-1},$$

am Tag 13 der Schwangerschaft auf

$$0.16 \pm 0.02 \text{ m}\mu\text{Mole Laktat} \times \mu\text{g DNA}^{-1} \times \text{min}^{-1}$$

und beträgt am Tag 14 der Schwangerschaft

$$0.15 \text{ m}\mu\text{Mole Laktat} \times \mu\text{g DNA}^{-1} \times \text{min}^{-1}.$$

In den Versuchen wurden als Inkubationsmedium Ratten- oder Krebs-Ringer-Phosphat-Lösung verwendet. Bei gleicher Glukosekonzentration (6 μMole) zeigten sich keine signifikanten Unterschiede. Alle Versuche wurden in Luftatmosphäre durchgeführt. Siehe Abbildung 3, 4, 5 und Tabelle III.

Tabelle III Laktatbildung in Abhängigkeit vom Alter der Rattenembryonan.

Stamm	Medium	Temperatur	Anzahl	Alter	Glukose	Laktatbildung
WISTAR SW 64	Serum	37° C	3	11	6 μ Mole	0.91 m μ Mole Laktat x μ g DNA ⁻¹ x min ⁻¹
						0.74
						<u>1.05</u>
						0.90 $\pm$ 0.155 (+ 0.0482)
WISTAR SW 68	Serum KRP	37° C	1	12	6 μ Mole	0.22
						0.18
						<u>0.20</u> $\pm$ 0.0283
WISTAR SW 64	Serum	37° C	1	13	6 μ Mole	0.12
						0.17
						0.18
						0.19
WISTAR SW 68	Serum	37° C	1	13	6 μ Mole	0.16
						<u>0.16</u>
						0.163 $\pm$ 0.024 (+ ϕ .0029333334)
WISTAR SW 64	Serum	37° C	1	14	6 μ Mole	0.145

Laktatbildung von 11, 13 und 14 Tage alten
Rattenembryonen

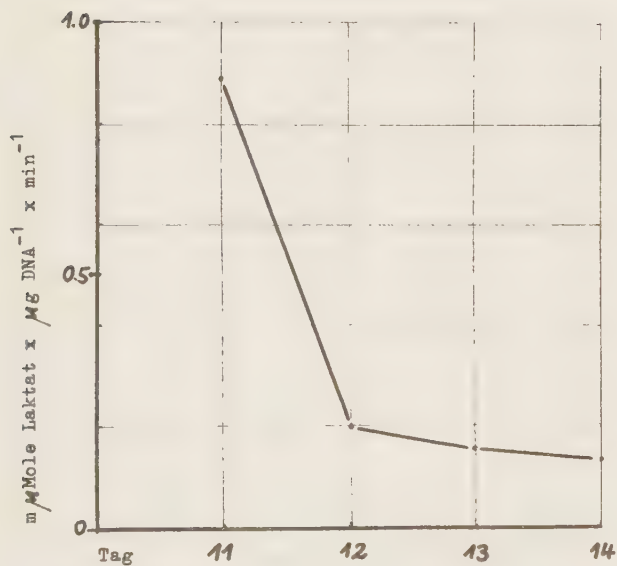


Abb. 3

Die Bildung von Milchsäure durch intakte Rattenembryonen vom Tag 11, 13 und 14 in vitro bei 37°C in Serum mit Zusatz von 0.1 % Glucose in Gegenwart von Luft ist am Tag 11 besonders hoch und fällt zum Tag 12 bis 14 rapide ab.

Beispiel eines Versuches.

Jeder Punkt gibt einen Meßwert wieder (3 Embryonen pro Ansatz). Die für die einzelnen Meßpunkte benutzten Embryonen stammten von verschiedenen Müttern. Es wurden 6 gleichwertige Versuchsserien durchgeführt.

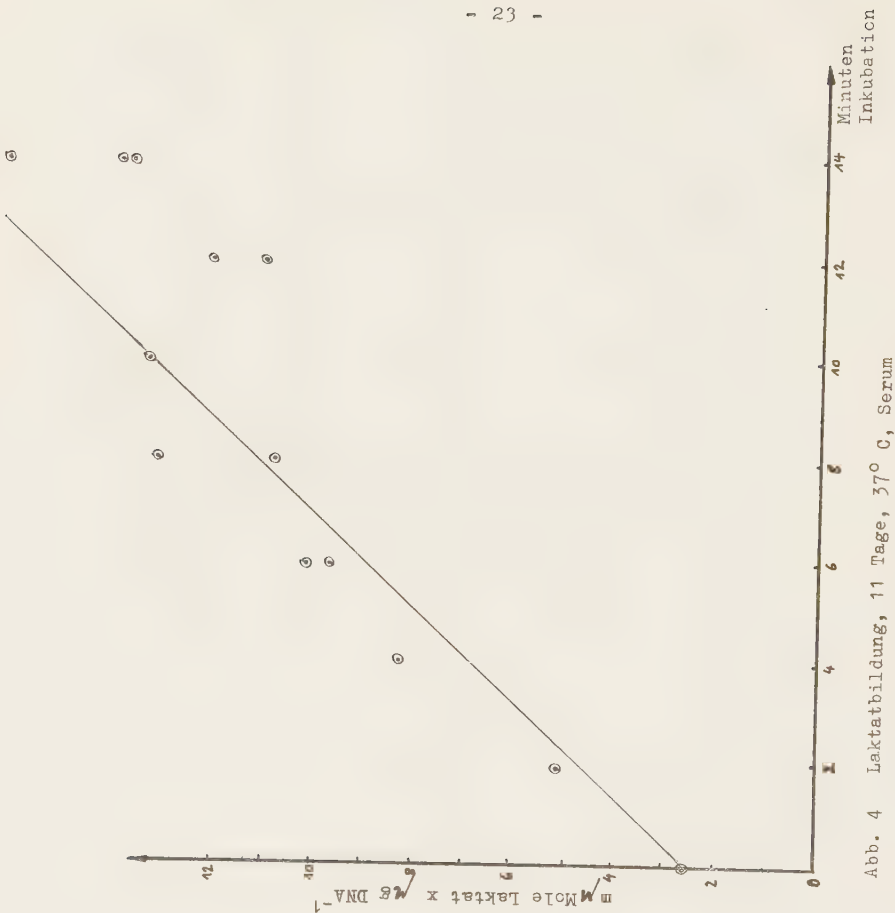


Abb. 4 Laktatbildung, 11 Tage, 37° C, Serum

Laktatbildung, 14 Tage, 37° C, Serum



Abb. 5

Versuchsbedingungen wie in Abb. 4.

Pro Ansatz wurde 1 Embryo benutzt.

2.2 Laktatbildung bei intakten Rattenembryonen bei veränderter Inkubations-Temperatur

Versuchsreihen mit einer Inkubations-Temperatur von 25° Celsius ergaben eine geringere Milchsäurebildung als bei 37° Celsius. Der Grund offenbart sich in der Tatsache, daß Reaktionen gemäß der Van't HOFF'schen Regel umso schneller ablaufen, je höher die Temperatur ist. Bei 25° Celsius liegt die Konzentration der gebildeten Milchsäure am Tag 11 der Schwangerschaft bei

$$0.44 \text{ m} \mu\text{Mole Laktat} \times \mu\text{g DNA}^{-1} \times \text{min}^{-1},$$

am Tag 13 der Schwangerschaft bei

$$0.11 \pm 0.01 \text{ m} \mu\text{Mole Laktat} \times \mu\text{g DNA}^{-1} \times \text{min}^{-1},$$

und am Tag 14 bei

$$0.06 \text{ m} \mu\text{Mole Laktat} \times \mu\text{g DNA}^{-1} \times \text{min}^{-1}.$$

(Abbildung 6, Tabelle IV)

Dies entspricht einem Q_{10} von etwa 2 in dem untersuchten Temperatur-Bereich.

2.21 Laktatbildung bei intakten Rattenembryonen vom Stamm WISTAR SW 69 bei verschiedenen Inkubations-Temperaturen

Mit dem Stamm WISTAR SW 69 wurde in einem späteren Versuch in Anwesenheit von Sauerstoff bei Rattenembryonen vom Tag 12 der Schwangerschaft bei gleicher Glukosekonzentration, aber unterschiedlicher Temperatur (25° und 37° Celsius) die Laktatbildung gemessen. Sie bestätigen die obengenannten Befunde.

(Siehe Tabelle V)

Tabelle IV Laktatbildung in Abhängigkeit von der Temperatur

Stamm	Medium	Temperatur	Anzahl	Alter	Glukose	Laktatbildung
WISTAR SW 64	Serum	25° C	3	11	6 μ Mole	Luft 0.44 m μ Mole Laktat x μ EDNA ⁻¹ x min ⁻¹
WISTAR SW 68	KRP	25° C	3	11	6 μ Mole	Luft 0.44
						0.44
WISTAR DDR	KRP	25° C	1	13	6 μ Mole	Luft 0.10 0.11 0.12
						0.11 $\pm$ 0.01 (+ 0.0002)
WISTAR DDR	KRP	25° C	1	14	6 μ Mole	Luft 0.055 0.06
						0.0575 $\pm$ 0.0035 (+ 0.0000125)

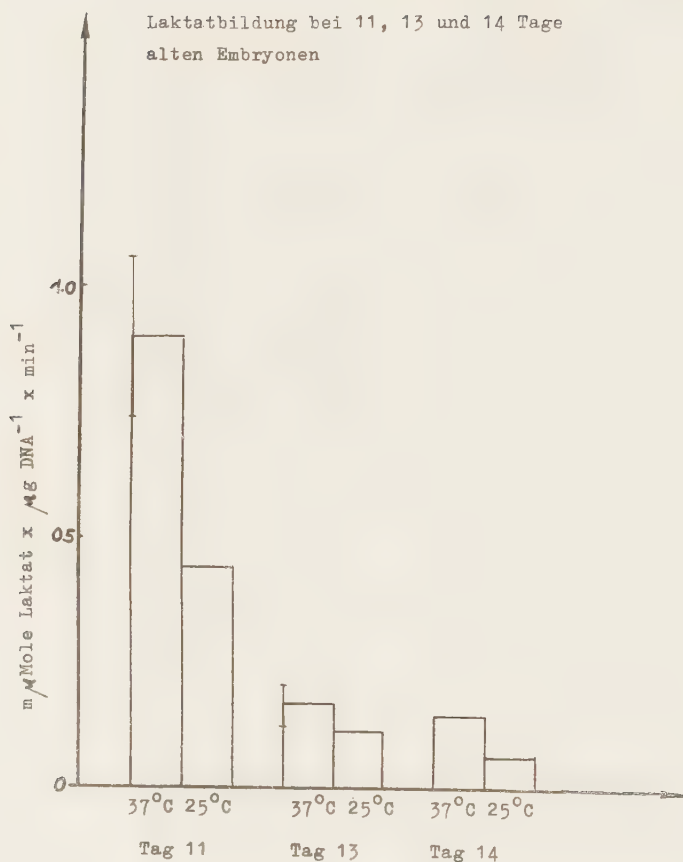


Abb. 6 zeigt Laktatbildung bei unterschiedlichen Inkubationstemperaturen.

Diese Versuchsserie mit intakten Rattenembryonen in vitro wurde bei 25° C durchgeführt. Gemäß der VAN'T HOFF'schen Regel ist die Reaktionsgeschwindigkeit und somit die Milchsäurebildung bei Temperaturerniedrigung vermindert.

Im Vergleich dazu die Laktatbildung bei 37°C.

Tabelle V Laktatbildung in Abhängigkeit von der Temperatur

Stamm	Medium	Temperatur	Anzahl	Alter	Glukose	Laktatbildung
WISTAR SW 69	KRP	25° C	6	12	2.5 μ Mole	0.023 m μ Mole Laktat x μ g DNA ⁻¹ x min ⁻¹
						0.022
						0.018
						0.021 $\pm$ 0.00265 (+ 0.000014)
WISTAR SW 69	KRP	37° C	6	12	2.5 μ Mole	0.051
						0.063
						0.074
						0.061
						0.062 $\pm$ 0.00943 (+ 0.00026675)

2.3 Laktatbildung bei intakten Rattenembryonen mit unterschiedlicher Glukosekonzentration

Bei den Versuchen wurde zunächst eine Glukosekonzentration von 0.1 g% benutzt; das entspricht der Blut-Konzentration und etwa 6 μ Molen Glukose. Zur Kontrolle wurde noch ein Versuch mit 0.05 g% Glukose durchgeführt. Der Anstieg in μ Mol Laktat pro Minute verringerte sich von 0.19 bei 0.1 g% Glukose auf 0.14 bei 0.05 g% Glukose.
(Siehe Abbildung 17)

In späteren Versuchsreihen wurde die Glukosekonzentration noch weiter variiert. Bei dem Stamm WISTAR SW 69 wurden pro Ansatz entweder 2.5 μ Mole Glukose oder 10 μ Mole Glukose verwendet. Am Tag 11 der Schwangerschaft sank die Milchsäurebildung von 0.38 μ Mole Laktat $\times$ μ g DNA⁻¹ $\times$ min⁻¹ bei einer Glukosekonzentration von 10 μ Molen auf 0.17 μ Mole Laktat $\times$ μ g DNA⁻¹ $\times$ min⁻¹ bei 2.5 μ Mole Glukose.

Versuche mit Embryonen vom Tag 12 der Schwangerschaft ergaben entsprechende Befunde.

(Siehe Abbildung 8, Tabelle VI)

Laktatbildung, 13 Tage, KRP - Lösung, 37° C

○ Glucosekonzentration von $3/4$ Molen Glucose/Ansatz
 • Glucosekonzentration von $6/4$ Molen Glucose/Ansatz



Abb. 7

Versuchsbedingungen wie in Abb. 4.

Pro Versuchsansatz wurde 1 Embryo eingesetzt.

Tabelle VI Laktatbildung von Rattenembryonen am Tag 11 bei unterschiedlicher Glukosekonzentration

Stamm	Temperatur	Medium	Alter	Anzahl	Glukose	Behandlung	Laktatbildung
WISTAR SW 69	37° C	KRP	11	10	2.5 μ M.	Luft	0.22 μ Mole Laktat $\times \mu$ g DNA ⁻¹ $\times$ min ⁻¹
							0.13
							0.14
							0.20
							0.16
							0.17 $\pm$ 0.0387 (+ 0.006)
WISTAR SW 69	37° C	KRP	11	10	10 μ Mole	Luft	0.39
							0.41
							0.36
							0.37
							0.37
							0.35
							0.376 $\pm$ 0.0217 (+ 0.00235)

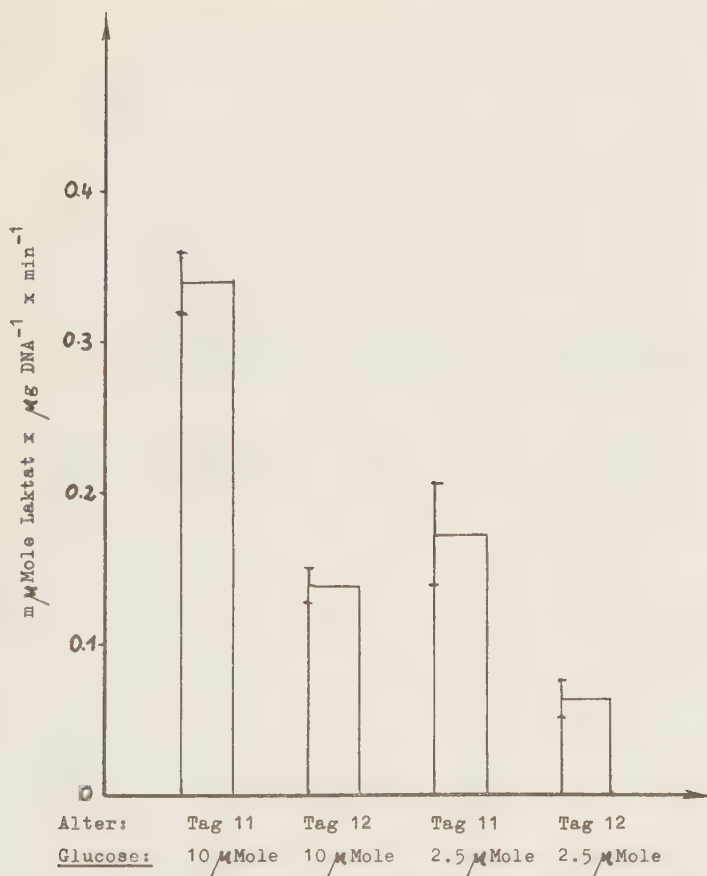


Abb. 8

Laktatbildung bei Rattenembryonen vom Tag 11 und 12 der Schwangerschaft in Abhängigkeit der Glucosekonzentration.

Tabellen VI und VIII

2.4 Laktatbildung bei intakten Rattenembryonen
in Gegenwart von reinem Sauerstoff

In einer Versuchsserie mit dem Stamm WISTAR SW 69 wurde zu Beginn der Inkubation reiner Sauerstoff in das Medium geleitet und die Versuche in einer O_2 - Gasatmosphäre durchgeführt. Die Ergebnisse, verglichen mit den Kontrolltieren, bewiesen, daß die Reaktion auch in Anwesenheit von reinem Sauerstoff mit gleich hoher und teilweise höherer Aktivität abläuft.

(Siehe Abbildung 9, 10 und Tabellen VII und VIII)

Tabelle VII Laktatbildung von 11 Tage alten Embryonen bei verschiedenen Glukosekonzentrationen, Sauerstoff oder Luft

Stamm WISTAR	Medium	Temperatur	Anzahl pro Ansatz	Alter	Behand- lung	Glukose- konzentration	Laktatbildung m μ Mole Laktat x μ g DNA ⁻¹ x min ⁻¹
SW 64	Serum	37° C	33	Tag 11	O ₂	6 μ Mole	0.91 0.74 } 0.825 $\pm$ 0.12 (0.01445)
SW 68	Serum	37° C	3	Tag 11	Luft	6 μ Mole	1.05
SW 64	Serum	25° C	3	Tag 11	Luft	6 μ Mole	0.44 0.44 } 0.44 $\pm$ 0
SW 68	KRP	25° C	3	Tag 11	Luft	6 μ Mole	0.44
SW 69	KRP	37° C	10	Tag 11	O ₂	2.5 μ M.	0.23 0.23 0.25 0.24 0.18 } 0.225 $\pm$ 0.0291 (0.0033892)
SW 69	KRP	37° C	10	Tag 11	Luft	2.5 μ M.	0.22 0.13 0.14 0.20 0.16 } 0.169 $\pm$ 0.0375 (0.0056388)
SW 69	KRP	37° C	10	Tag 11	O ₂	10 μ Mole	0.27 0.35 0.37 0.40 0.35 } 0.346 $\pm$ 0.046 (0.0084872)
SW 69	KRP	37° C	10	Tag 11	Luft	10 μ Mole	0.39 0.41 0.36 0.37 0.35 } 0.366 $\pm$ 0.0165 (0.0081275)

Tabelle VIII Laktatbildung von 12 Tage alten Embryonen in Abhängigkeit von Glukosekonzentrationen, Sauerstoff, Temperatur

Stamm WISTAR	Medium	Temperatur	Anzahl	Alter	Behandlung	Glukosekonzentration	m μ Mole Laktat x μ g DNA ⁻¹ x min ⁻¹
SW 69	KRP	37° C	6	12	O ₂	2.5 μ Mole	$\left. \begin{array}{l} 0.067 \\ 0.054 \\ 0.064 \\ 0.055 \\ 0.052 \end{array} \right\} 0.0584 \pm 0.0067 (+0.0001772)$
SW 69	KRP	37° C	6	12	O ₂	10 μ Mole	$\left. \begin{array}{l} 0.074 \\ 0.101 \\ 0.079 \\ 0.088 \end{array} \right\} 0.0855 \pm 0.0119 (0.000421)$
SW 69	KRP	37° C	6	12	Luft	2.5 μ Mole	$\left. \begin{array}{l} 0.065 \\ 0.052 \\ 0.051 \\ 0.063 \\ 0.082 \end{array} \right\} 0.0626 \pm 0.0125 (0.0006292)$
SW 69	KRP	37° C	6	12	Luft	10 μ Mole	$\left. \begin{array}{l} 0.140 \\ 0.134 \\ 0.150 \\ 0.120 \\ 0.133 \end{array} \right\} 0.1354 \pm 0.0109 (0.0004792)$
SW 69	KRP	37° C	6	12	O ₂	2.5 μ Mole	$\left. \begin{array}{l} 0.051 \\ 0.063 \\ 0.074 \\ 0.061 \end{array} \right\} 0.06225 \pm 0.0094 (0.00026675)$
SW 69	KRP	25° C	6	12	O ₂	2.5 μ Mole	$\left. \begin{array}{l} 0.023 \\ 0.022 \\ 0.018 \end{array} \right\} 0.021 \pm 0.00265 (0.000014)$

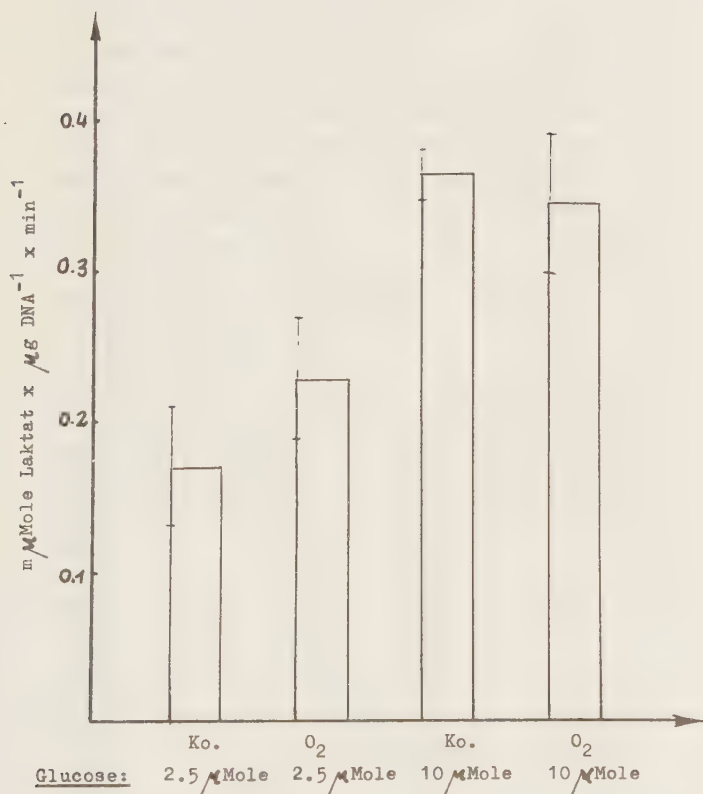


Abb. 9

Laktatbildung bei Rattenembryonen vom Stamm WISTAR SW 69 am Tag 11 der Schwangerschaft in Abhängigkeit von Luft (Ko.), Sauerstoff und Glucose im Medium.

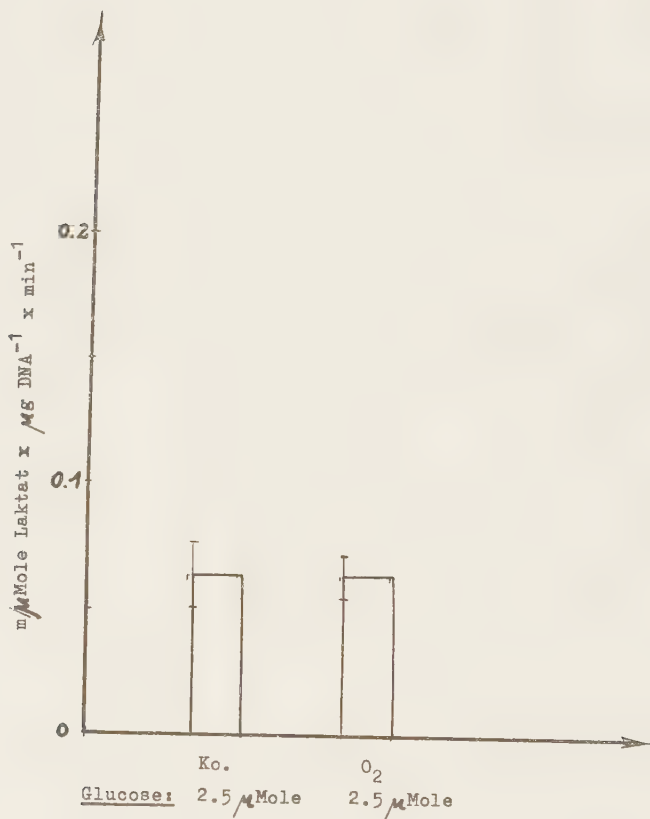


Abb. 10

Laktatbildung bei Rattenembryonen vom Stamm WISTAR SW 69 am Tag 12 der Schwangerschaft in Abhängigkeit von Sauerstoff.

3. Versuche mit Cyclophosphamid

Cyclophosphamid (Endoxan) ist eine alkylierende Substanz und wirkt embryotoxisch.

8 mg pro kg Körpergewicht Cyclophosphamid wurden trächtigen Ratten vom Stamm WISTAR SW 68 am Tag 11 der Schwangerschaft intraperitoneal injiziert. Nach 48 Stunden wurden die Embryonen herauspräpariert und der DNA-Gehalt, der Laktatgehalt und die Laktatbildung bestimmt.

3.1 Bestimmung des DNA-Gehaltes

(13 Tage alte Embryonen)

Tabelle IX

mit Endoxan vorbehandeltes Muttertier (nach 48 Stunden)	Kontrollen (Tag 13)
275 μ g DNA/ Embryo	344 μ g DNA/ Embryo
213	350
275	350
250	350
275	336
250	362
250	325
287	362
250	450
264	375
287	450
250	400
236	362
287	350
264	362
264	
$\bar{x} 261.063 \pm 20.29$	$\bar{x} 366.53 \pm 39.39$
(6176.937) n = 16	(21717.734) n = 15
t = + 9.4619 p < 0.0027	

Tabelle IX demonstriert, daß der Gesamt-DNA - Gehalt der Embryonen, deren Muttertiere mit Cyclophosphamid vorbehandelt wurden, niedriger ist als der der Kontrolltiere. Die Werte der Kontrolltiere stimmen in etwa mit den Untersuchungen von KÖHLER (1970) überein.

3.2 Messung des Laktatgehaltes und der Laktatbildung

Der Laktatgehalt und auch die Glykolyserate der mit Cyclophosphamid vorbehandelten Tiere sind im Vergleich zu den Kontrolltieren deutlich höher .

(Abb. 11, 12, 13)

Tabelle X

Tabelle X

Tierstamm	Alter	Temperatur	Anzahl	Behandlung	Laktatgehalt m μ Mole Laktat x μ g DNA ⁻¹
WISTAR SW 68	13	37° C	1	8 mg/kg Endoxan (48 Std.)	2.0 2.7 2.5 2.4 $\pm$ 0.361 (+ 0.26)
WISTAR SW 68	13	37° C	1	Kontroll- tiere	1.7 1.6 1.65 $\pm$ 0.071 (0.005)
WISTAR SW 68	13	37° C	1	8 mg/kg Endoxan (48 Std.)	Laktatbildung m μ Mole Laktat x μ g DNA ⁻¹ x min ⁻¹ 0.22 0.10 0.20 $\pm$ 0.028 (+ 0.0008)
WISTAR SW 68	13	37° C	1	Kontroll- tiere	0.16 0.16 0.16 $\pm$ 0

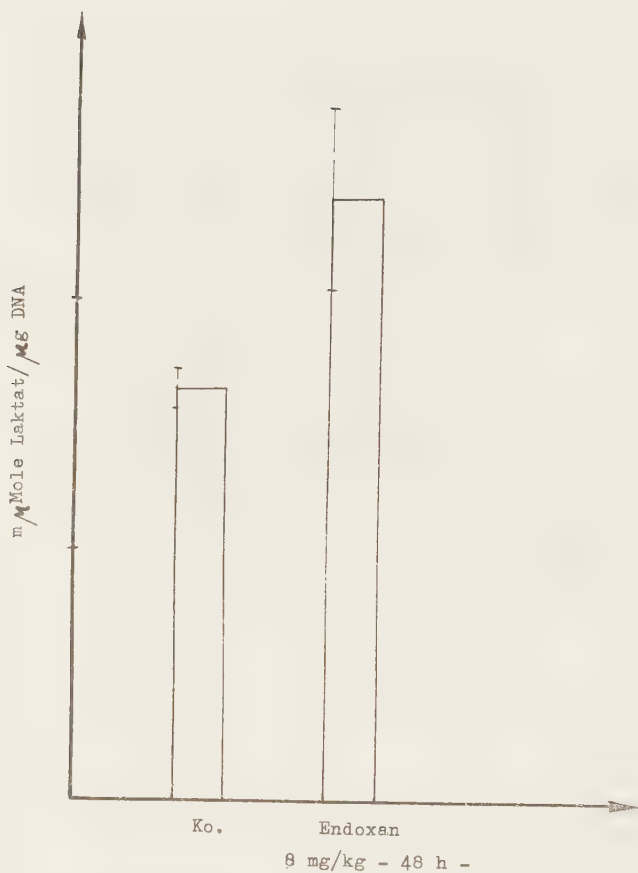


Abb. 11

Stationärer Laktatgehalt bei Rattenembryonen vom Stamm WISTAR SW 68 am Tag 13 der Schwangerschaft, deren Muttertiere mit ENDOXAN vorbehandelt wurden.

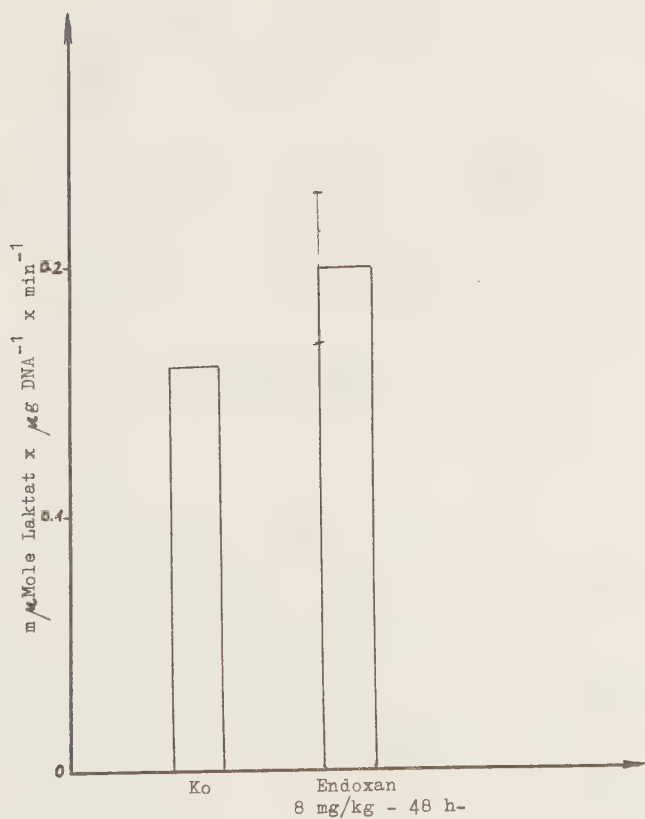


Abb. 12

Laktatbildung bei Rattenembryonen vom Stamm WISTAR SW 68 am Tag 13 der Schwangerschaft, deren Muttertiere mit ENDOXAN vorbehandelt wurden.

Laktatbildung, 13 Tage, 37° C, Serum

○ Endoxan: 8 mg/ kg Körpergewicht / 48 Std.

• Ko.



Abb. 13

Experimentelle Bedingungen wie in Abb. 4.

Pro Versuchsansatz wurde 1 Embryo eingesetzt.

4. Versuche mit 6 - Aminonicotinamid

6-Aminonicotinamid wird in die Pyridinnucleotide NAD oder NADP anstelle von Nicotinamid eingebaut. Es kommt zu Veränderungen im Stoffwechsel, da diese 6-Aminonicotinamidanalogen als kompetitive Hemmstoffe NAD bzw. NADP-abhängiger Oxidoreduktasen wirken. 6-AN ist als teratogene Substanz bei Ratten und Mäusen bekannt (CHAMBERLAIN 1966). Zur Klärung der Frage, ob auch die Glykolyse bei Rattenembryonen gestört ist, wurde Muttertieren am Tag 11, 12 und 13 der Schwangerschaft 6-Aminonicotinamid in unterschiedlichen Dosen intraperitoneal injiziert und die Embryonen nach 4, 5, 6 und 26 Stunden untersucht.

4.1 Laktatgehalt bei Versuchen mit 6-AN

Die ersten Versuche mit 6-Aminonicotinamid wurden mit Rattenembryonen vom Stamm WISTAR SW 64 vom Tag 13 der Schwangerschaft durchgeführt. Den Muttertieren wurde in einer Versuchsreihe 8 mg 6-AN/ kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert und die Embryonen nach 6 Stunden präpariert. Der Laktatgehalt mit

$$0.83 \pm 0.281 \text{ m}\mu\text{Mole Laktat/} \mu\text{g-DNA}$$

lag niedriger als der der Kontrolltiere:

$$1.7 \pm 0.13 \text{ m}\mu\text{Mole Laktat/} \mu\text{g-DNA.}$$

Versuche mit 5 mg 6-AN/ kg Körpergewicht in 5 Stunden bei 13 Tage alten Embryonen zeigten im

Laktatgehalt ähnliche Werte :

$$0.9 \pm 0 \text{ m}\mu\text{Mole Laktat/} \mu\text{g-DNA.}$$

(Abb. 14, Tab. XI)

Spätere Versuche mit Embryonen, Stamm WISTAR SW 69 vom Tag 11 der Schwangerschaft ergaben nach Einwirkung von 8 mg 6-AN / kg Körpergewicht für 4 Stunden höhere Laktatwerte:

$$4.33 \pm 0.03 \text{ m}\mu\text{Mole Laktat/} \mu\text{g-DNA}$$

als die gleichaltrigen Kontrolltiere;

$$3.49 \pm 0.105 \text{ m}\mu\text{Mole Laktat/} \mu\text{g-DNA.}$$

Bei einem Versuch wurde Muttertieren, Stamm WISTAR SW 69, vom Tag 12 der Schwangerschaft 8 mg 6-AN /kg Körpergewicht intraperitoneal injiziert und die Embryonen erst nach 26 Stunden präpariert. Der DNA-Gehalt war in diesem Fall um 30 % vermindert und der stationäre Laktatgehalt lag in der gleichen Größenordnung wie der der Kontrolltiere.

(Abb. 15 und 16, Tab. XI)

Tabelle XI Laktatgehalt

Stamm	Alter	Anzahl	Behandlung	Laktatgehalt mMole Laktat x μ g DNA ⁻¹
WISTAR SW 64	13	1	8 mg 6-AN/ kg KG/ 6 Std.	0.7
				0.4
				1.0
				1.1
				1.1
				0.7
n = 6 (0.393333334)				0.83 $\pm$ 0.281
WISTAR SW 64	13	1	Kontrollen	1.9
				1.6
				1.6
				1.8
				1.7
				1.6
n = 6 (0.08) t = + 6.92622				1.7 $\pm$ 0.12649
WISTAR SW 64	13	1	5 mg 6-AN/ kg KG/ 5 Std.	0.9
				0.9
				0.9
				0.9
WISTAR SW 69	11	10	8 mg 6-AN/ kg KG/ 4 Std.	4.30
				4.33
				4.36
n = 3 (0.0018)				4.33 $\pm$ 0.03
WISTAR SW 69	11	10	Kontrollen	3.4
				3.7
				3.5
				3.5
				3.6
				3.4
				3.4
				3.5
				3.4
n = 9 (0.0888889) t=13.2467				3.489 $\pm$ 0.1054
WISTAR SW 69	12	6	8 mg 6-AN/ kg KG/ 26 Std.	2.90
				3.22
				2.87
n = 3 (0.7326666)				2.994 $\pm$ 0.194
WISTAR SW 69	12	6	Kontrollen	3.1
				2.9
				3.0
				3.2
				2.3
				2.9
n = 6 (0.10833334) t= -0.0564				2.98 $\pm$ 0.1472

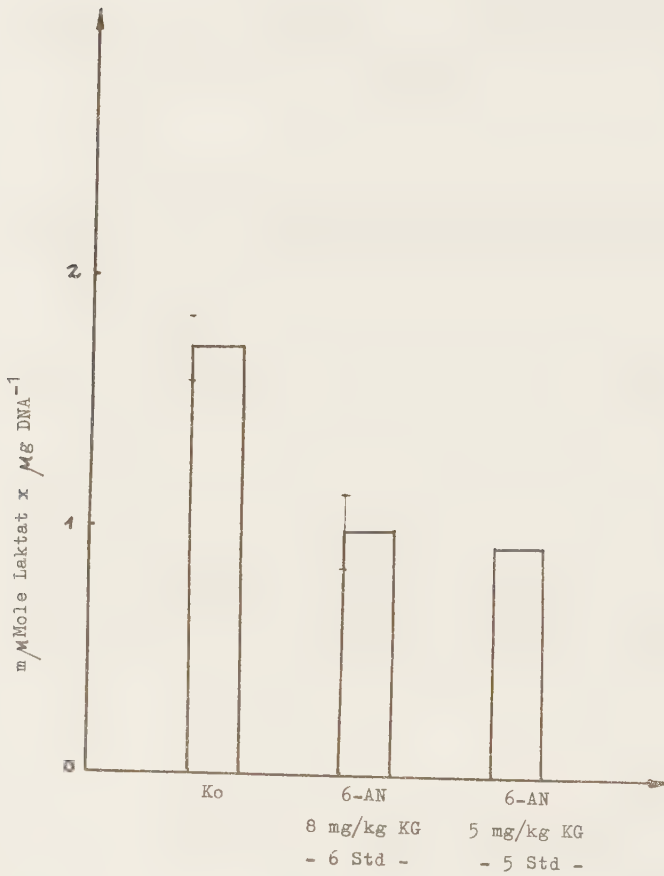


Abb. 14

Stationärer Laktatgehalt bei Rattenembryonen vom Stamm WISTAR SW 68 am Tag 13 der Schwangerschaft nach Einwirkung von 6-AN

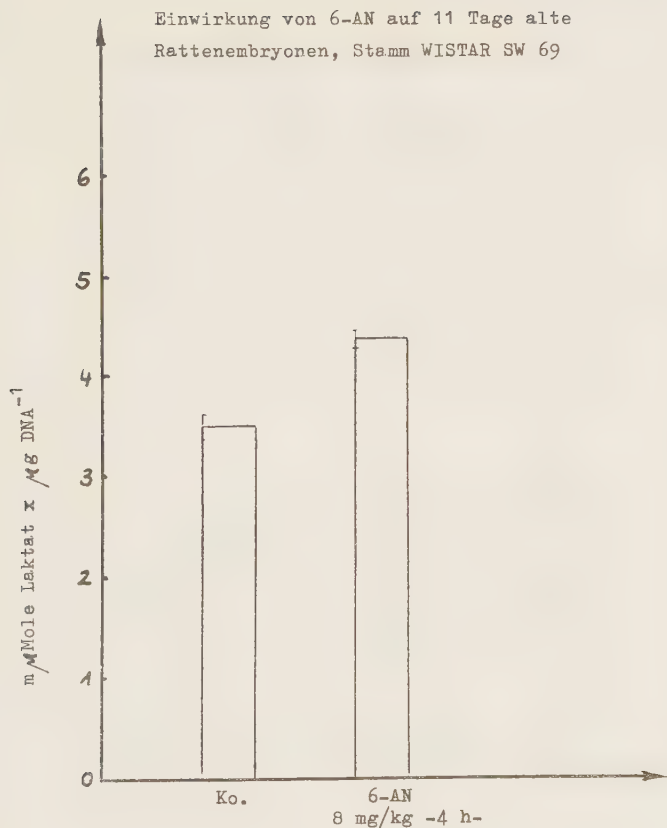


Abb. 15 Laktatgehalt

Den Muttertieren wurde 4 Stunden vor der Präparation 8 mg/kg KG 6-AN intraperitoneal injiziert. Die schnell herauspräparierten Embryonen wurden sofort mit HClO_4 behandelt und auf dem üblichen Wege der Milchsäuregehalt bestimmt.

Die mit 6-AN vorbehandelten Tiere hatten einen höheren Gehalt an Milchsäure als die Kontrolltiere.

Einwirkung von 6-AN auf 12 Tage alte
Rattenembryonen vom Stamm WISTAR SW 69

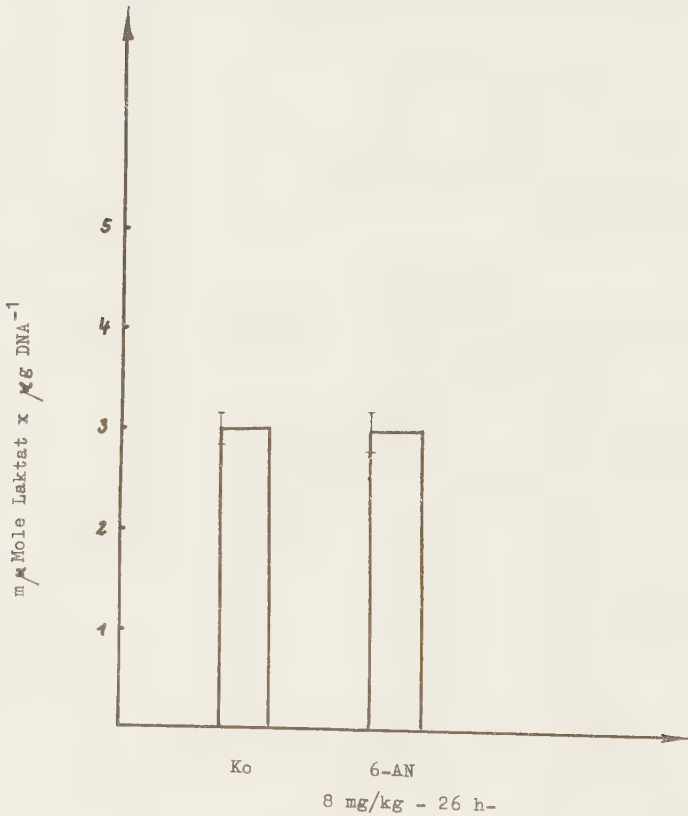


Abb. 16 Laktatgehalt

Bei diesem Versuch wurden die Muttertiere
bereits 26 Stunden vor der Präparation mit
8 mg/kg 6-AN behandelt.

Auffällig war, daß die DNA bei diesen Ratten-
embryonen im Vergleich zu den Kontrolltieren
um 30 % vermindert war.

4.2 Laktatbildung bei Versuchen mit 6-AN

Um in der gleichen Reihenfolge zu bleiben, werden zunächst die Versuche mit den Embryonen vom Tag 13 der Schwangerschaft vom Stamm WISTAR SW 64 beschrieben. Die Embryonen, deren Muttertiere mit 8 mg 6-AN/ kg Körpergewicht vorbehandelt wurden, zeigten eine verminderte Laktatbildung:

$0.096 \pm 0.015 \text{ m}\mu\text{Mole Laktat/}\mu\text{g DNA} \times \text{min}$
im Gegensatz zu den Kontrolltieren :

$0.153 \pm 0.036 \text{ m}\mu\text{Mole Laktat/}\mu\text{g DNA} \times \text{min.}$
(Abb. 17)

Versuchsreihen mit dem Stamm WISTAR SW 69 ergaben bei Embryonen, deren Muttertiere am Tag 11 der Schwangerschaft mit 8 mg 6-AN/ kg Körpergewicht behandelt und die Embryonen nach 4 Stunden präpariert wurden, eine verminderte Glykolyserate:

$0.268 \pm 0.029 \text{ m}\mu\text{Mole Laktat/}\mu\text{g DNA} \times \text{min,}$
Kontrolltiere:

$0.376 \pm 0.024 \text{ m}\mu\text{Mole Laktat/}\mu\text{g DNA} \times \text{min.}$
(Abb. 18)

Bei den Versuchen mit Rattenembryonen vom Tag 12 der Schwangerschaft, Stamm WISTAR SW 69, wurden jedoch nach Einwirkung von 8 mg 6-AN/kg Körpergewicht/ 26 Stunden völlig andere Ergebnisse erhalten:

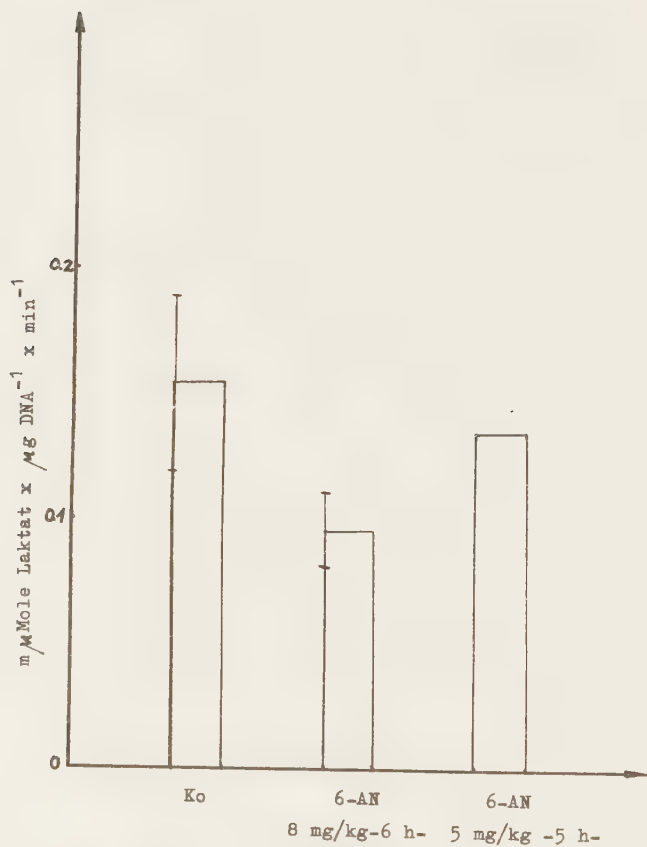


Abb. 17

Laktatbildung nach Einwirkung von 6-AN bei
Rattenembryonen vom Stamm WISTAR SW 64 am
Tag 13 der Schwangerschaft.

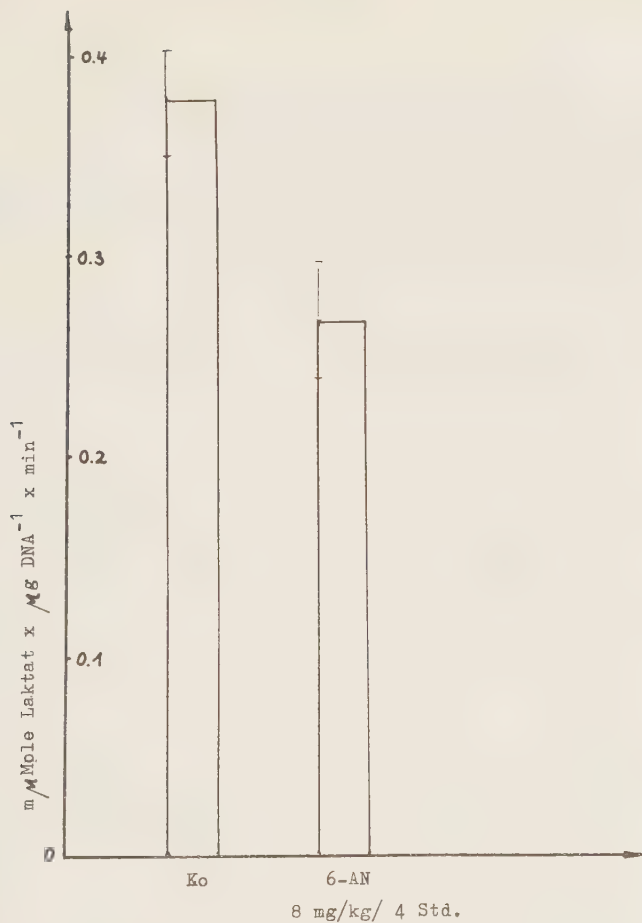


Abb. 18

Laktatbildung bei Rattenembryonen vom Stamm WISTAR SW 69 am Tag 11 der Schwangerschaft, deren Muttertiere mit 6-AN vorbehandelt wurden.

Die Laktatbildung war im Vergleich zu den Kontrolltieren hoch. Zu berücksichtigen ist dabei aber der um 30 % verminderte DNA - Gehalt. Die Embryonen verhielten sich also mehr wie 11 Tage alte Embryonen, die ja ebenfalls noch eine hohe Rate der Laktatbildung aufweisen.

(Abb. 19, 20, 21, 22, Tab. XII)

Tabelle XII Laktatbildung

Stamm	Alter	Anzahl	Medium	Temp.	Glukose	Behandlung	Laktatbildung m μ Mole Laktat $\times$ 1 μ g DNA ⁻¹ x min ⁻¹
WISTAR SW 64	13	1	Serum	37°C	6 μ Mole	8 mg 6-AN/ kg/ 6 Std.	0.12 0.09 0.09 0.10 0.08
n = 5 (0.00092)							0.096 $\pm$ 0.0152
WISTAR SW 64	13	1	Serum	37°C	6 μ Mole	Kontrollen	0.12 0.13 0.18 0.19 0.16 0.16
n = 6 (0.0063333334) t = + 3.333							0.1533 $\pm$ 0.0356
WISTAR SW 64	13	1	Serum	37°C	6 μ Mole	5 mg 6-AN/ kg/ 5 Std.	0.135 0.135
							0.135
WISTAR SW 69	11	10	KRP	37°C	10 μ M.	6 mg 6-AN/ kg KG/ 4 Std.	0.26 0.27 0.31 0.27 0.23
n = 5 (0.00328)							0.268 $\pm$ 0.286
WISTAR SW 69	11	10	KRP	37°C	10 μ M.	Kontrollen	0.39 0.41 0.36 0.37 0.35
n = 5 (0.00232) t = + 6.454							0.376 $\pm$ 0.02408

Fortsetzung
Tabelle XII Laktatbildung

Stamm	Alter	Anzahl	Medium	Temp.	Glukose	Behandlung	Laktatbildung $\frac{\mu\text{Mole Laktat}}{\mu\text{g DNA}} \cdot \frac{x}{\text{min}}$
WISTAR SW 69	12	6	KRP	37°C	10 μM .	8 mg 6-AN/ kg KG/ 26 Std.	0.16 0.17 0.21 0.25 0.22 0.17
n = 6 (0.0063333333)							0.1967 $\pm$ 0.0356
WISTAR SW 69	12	6	KRP	37°C	10 μM .	Kontrollen	0.15 0.16 0.14 0.15 0.13
n = 5 (0.00052) t = - 3.034							0.146 $\pm$ 0.0114

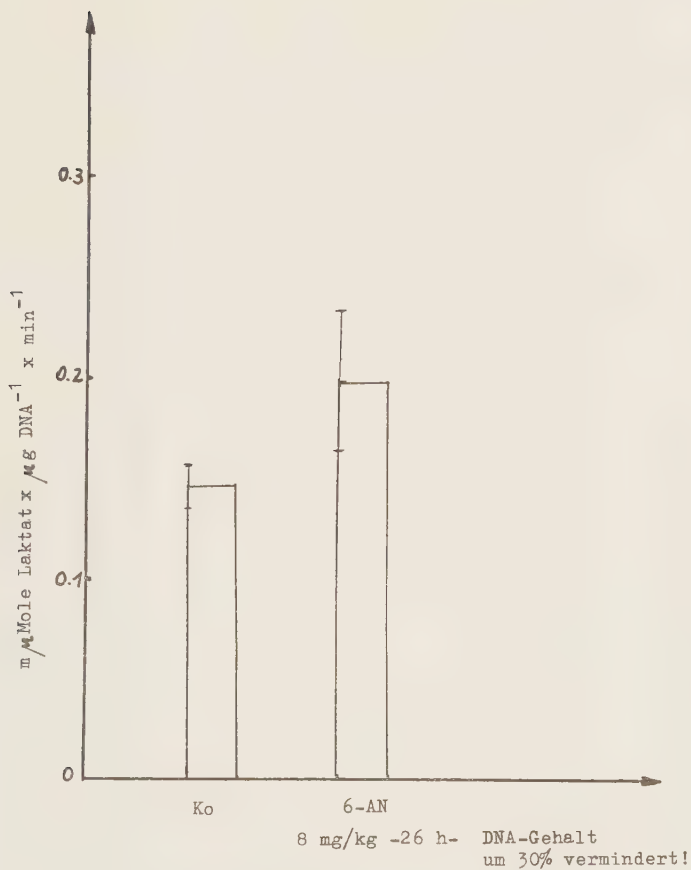


Abb. 19

Laktatbildung bei Rattenembryonen vom Stamm WISTAR SW 69 am Tag 12 der Schwangerschaft, deren Muttertiere 26 Stunden vor der Präparation mit 6-AN behandelt wurden.

Laktatbildung von Rattenembryonen Tag 13 der Schwangerschaft,
 37° C, Serum

○ Embryonen, deren Muttertiere mit 8 mg 6-AN/kg KG/6 Std. vorbehandelt wurden
 • Kontrolltiere



Abb. 20
 Experimentelle Bedingungen wie in Abb. 4.
 Pro Ansatz wurde 1 Embryo eingesetzt.

Laktatbildung von Rattenembryonen Tag 13 der Schwangerschaft,
37° C, Serum

○ 8 mg 6-AN/ kg Körpergewicht / 6 Std

• Kontrolltiere



Abb. 21

Experimentelle Bedingungen wie in Abb. 4.

Pro Ansatz wurde 1 Embryo eingesetzt

Laktatbildung von Rattenembryonen Tag 13 der Schwangerschaft
37° C, Serum

○ 8 mg 6-AN/ kg Körpergewicht / 6 Std
• Kontrolltiere



Abb. 22

Experimentelle Bedingungen wie in Abb. 4.

Pro Ansatz wurde 1 Embryo eingesetzt.

IV. Diskussion

=====

Ausgehend von dem Problem, woher die Embryonen die Energie für ihren Stoffwechsel nehmen, stellte sich die Frage nach der Effektivität der Glykolyse im embryonalen Säugetiergewebe. Nach WARBURG soll eine Glykolyse in Anwesenheit von Sauerstoff - wie bei schnell wachsendem Tumorgewebe - bei Embryonen nicht stattfinden. Unsere Versuche, die in Anwesenheit von Sauerstoff durchgeführt wurden, bewiesen jedoch, daß eine aerobe Glykolyse stattfinden kann. Auch die Ansicht WARBURGS, daß die Embryonen durch das Schütteln bei der Inkubation geschädigt oder sogar zerstört wurden, konnte durch elektrenenmikroskopische Untersuchungen von MERKER nicht bestätigt werden. Noch nach 1 Stunde Inkubation konnten weitgehend intakte Zellstrukturen erkannt werden, wenn die Inkubation in Rattenserum durchgeführt wurde.

Ogleich seit den Arbeiten von DRUCKREY, BROCK und HERKEN (1936, 1938) bekannt ist, daß ein "Schädigungsstoffwechsel" mit einer erhöhten Glykolyserate einhergehen kann, ergeben unsere Ergebnisse keinen Anhalt für eine solche Interpretation. Versuche von SPIELMANN und LÜCKE (1970) haben außerdem gezeigt, daß die Grenzschnittsdicke WARBURGS bei 11 und 12 Tage alten Rattenembryonen bei Verwendung von reinem Sauerstoff als Gasphase noch eingehalten wird.

TANIMURA und SHEPARD (1970) verwendeten für ähnliche Versuche intakte Rattenembryonen vom Tag 10 bis 12 der Schwangerschaft, die sie in den Fruchthüllen ließen und in einer in-vitro-Kultur nach NEW (1966) inkubierten. Sie fanden ebenfalls einen Laktatabfall von Tag 10 bis 12 der Schwangerschaft. Gleichzeitig widerlegen sie damit die Behauptung von NEGELEIN, eine aerobe Glykolyse der Embryonen, umgeben von Fruchtwasser und Fruchthülle, fände nicht oder nur sehr gering statt. Die Ansicht von NEGELEIN (1925), daß die an Rattenembryonen gemessene aerobe Laktatbildung die Folge einer Schädigung sei, ist damit nicht haltbar.

1.1 Laktatgehalt und Laktatbildung

Die ersten Untersuchungen ergaben, daß der stationäre Laktatgehalt am Tag 11 der Schwangerschaft hoch ist und dann am Tag 12 auf ein Drittel abfällt. Die Ursache dafür ließe sich durch eine verminderte Transportkapazität des Embryos zum Muttertier für Laktat am Tag 11 der Schwangerschaft als ein vermehrter Anfall von Milchsäure deuten. Der Grund dafür könnte die Unfähigkeit des Embryos sein, das gebildete Laktat über den Zitronensäurezyklus zu oxidieren. Dabei könnte der Krebszyklus selbst intakt sein und nur die "shuttle" - Mechanismen, die die Wasserstoffäquivalente aus dem Hyaloplasma in die Mitochondrien transportieren, wären noch nicht

voll ausgebildet. Von BARRACH (1970) wurde eine niedrige Aktivität der alpha- Glycerophosphatdehydrogenase im Hyaloplasma gefunden. Interessanterweise erfolgt am Tag 12 der Schwangerschaft der Anschluß an die Plazenta und so wäre denkbar, daß ein großer Teil der Milchsäure plazentar abtransportiert wird.

Spätere Versuche mit dem Stamm WISTAR SW 69 ergaben allerdings etwas andere Werte. Der stationäre Laktatgehalt vom Tag 11 zu Tag 12 der Schwangerschaft verminderte sich nur von

$$\begin{array}{l} 3.49 \pm 0.105 \text{ m}\mu\text{Mole Laktat} / \mu\text{g DNA auf} \\ 2.98 \pm 0.197 \text{ m}\mu\text{Mole Laktat} / \mu\text{g DNA.} \end{array}$$

Die unterschiedlichen Befunde stammen von verschiedenen Tierstämmen. Es gilt zu prüfen, ob bei Verwendung von anderen Stämmen ähnliche Abweichungen auftreten.

Erstaunlich ist der hohe Gehalt an Milchsäure in allen vier gemessenen Stadien. Zu erwarten wäre eine acidotische Stoffwechsellage, die aber für den Embryo durchaus physiologisch sein kann. Interessant wäre in diesem Zusammenhang zu wissen, welchen pH- Wert und Standard-Bicarbonat ein Embryo in den verschiedenen Entwicklungsstadien hat und ob ein Gegenregulationsmechanismus besteht.

Auch über die Sauerstoffspannung im Embryo gibt es bisher keine genauen Angaben. Es ist durchaus möglich, daß vor dem Placental-Anschluß eine so niedrige O_2 - Spannung vorliegt, daß die nachgewiesene Fähigkeit des Embryos zur aeroben Glykolyse gar nicht ausgenutzt wird und die Energie durch anaerobe Glykolyse gewonnen wird.

Die Glykolyserate sinkt zwischen dem Tag 11 und Tag 12 der Schwangerschaft auf etwa ein Fünftel ab. Da der Energiegewinn über die Glykolyse im Gegensatz zu oxidativen energieliefernden Reaktionen gering ist, erhebt sich die Frage, weshalb die Embryonen diesen Weg in so hohem Maße beschreiten. Da die Embryonen in frühen Entwicklungsstadien wenig Mitochondrien (MERKER, unpubliziert) besitzen, ist es interessant zu wissen, inwieweit die Atmung in frühen Entwicklungsstadien funktioniert.

Untersuchungen von NETZLOFF et al. (1968) zeigten an Rattenembryonen, daß der Sauerstoffverbrauch am Tag 11 der Schwangerschaft relativ hoch, am Tag 12 wesentlich geringer ist und an den folgenden Tagen nur noch gering absinkt. SPIELMANN (1970) dagegen fand bei seinen Untersuchungen, daß die Embryonen bei sicher eingehaltener Grenzschnittdicke eine große Atmungskapazität haben, die vom Tag 11 bis 13 nicht meßbar abnimmt. In parallelversuchen arbeitete BASS (1971) mit Mito-

chondrienhomogenaten unterschiedlicher Altersgruppen, denen er verschiedene Substrate des Zitronensäurezyklus anbot. Nach Zugabe von ADP wurden diese Substrate am Tag 12 und 13 nur wenig veratmet, besser aber am Tag 14 der Schwangerschaft. Damit scheint erwiesen, daß die Mitochondrien noch im Stadium der Entwicklung sind und bestimmte Fermente am Tag 12 und 13 noch nicht voll ausgebildet sind. Sicher scheint, daß die Kapazität zur Atmung in frühen Entwicklungsstadien vorhanden ist. Eine Reihe der vorhandenen Resultate sprechen dafür, daß bevorzugt Fettsäuren veratmet werden.

1.2 Einfluß der Glukosekonzentration auf die Glykolyse

Die Glukoseaufnahme in die Zellen vieler erwachsener Gewebe ist abhängig von der Konzentration im Medium, von der Temperatur und dem Insulingehalt. In einigen Versuchen wurde die Konzentration der Glukose im Medium variiert. Zunächst wurden statt 6 μ Mole Glukose nur 3 μ Mole Glukose pro Ansatz gegeben. Die Differenz der Laktatbildung war gering, der Glukoseverbrauch wurde in diesen Versuchen nicht bestimmt. Die Werte stimmen mit den Untersuchungen von TANIMURA und SHEPARD (1970) überein, die Konzentrationen von 6 mM und 3.8 mM Lösungen benutzten und keinen signifikanten Unterschied zwischen Glukosekonzentration und Glukoseverbrauch fanden.

In eigenen weiteren Versuchen wurden $2.5 \mu\text{Mole}$ Glukose und $10 \mu\text{Mole}$ Glukose pro Ansatz verwendet. Dabei zeigte sich, daß bei Verwendung von $2.5 \mu\text{Molen}$ Glukose im Medium die Glykolyserate um mehr als die Hälfte zurückging. So kann man sagen, daß die Laktatbildung abhängig ist von der Glukosekonzentration.

Der Glukoseverbrauch ist im Gegensatz zu anderen Geweben bei embryonalem Gewebe hoch. Nach Untersuchung von NEUBERT et al. (1971) beträgt der Glukoseverbrauch am Tag 12 nur noch knapp ein Fünftel vom Tag 11 der Schwangerschaft. Dies entspricht auch der Glykolyserate.

1.3 Einfluß der Inkubations - Temperatur.

Normalerweise findet sich bei Erhöhung der Temperatur um 10° Celsius eine Steigerung der Reaktionsgeschwindigkeit enzymatischer Reaktionen auf das Doppelte (VAN T'HOFF). Der " Q_{10} " enzymatischer Reaktionen kann jedoch bei verschiedenen Fermenten zwischen 1.5 und 4 liegen. Unsere Versuche mit unterschiedlicher Inkubations-Temperatur, nämlich bei 25°C und 37°C , zeigten, daß die Reaktionsgeschwindigkeit der Glykolyse bei 25°C tatsächlich um etwa die Hälfte vermindert ist.

2. Einfluß einer Behandlung mit teratogenen Substanzen

2.1 Cyclophosphamid (Endoxan)

Die embryotoxische Wirkung von Cyclophosphamid kann bei Ratten schon mit Dosen erreicht werden, die 1/20 der mütterlichen LD 50 betragen (von KREYBIG et al. 1966, CHAUBE et al. 1967).

Unsere Versuche ergaben im Vergleich zu den Kontrolltieren bezogen auf den Gesamt-DNA-Gehalt einen höheren Laktatgehalt und auch eine höhere Laktatbildung. Diese Zunahme mag aber nur scheinbar sein, da der DNA-Gehalt der Embryonen stark vermindert ist. Bei einer Retardierung der Embryonen entsprechen die am Tag 12 der Schwangerschaft untersuchten Embryonen solchen vom Tage 11, die eine höhere Glykolyserate aufweisen. Der verminderte DNA-Gehalt bestätigt morphologische Befunde von CHAUBE und KREYBIG (1967, 1966), die Wachstumsretardierungen und schwere Skelet- und Gehirnmisbildungen fanden, allerdings bei einer Beurteilung vom Tage 20 der Schwangerschaft.

2.2 6-Aminonicotinamid

Wie bereits angeführt, wird 6-Aminonicotinamid embryotoxisch. Es greift offenbar in verschiedene Stoffwechselvorgänge ein. MERKER (1970) fand bei elektronenmikroskopischen Betrachtungen, daß morphologische Veränderungen bei Zellen auftreten,

die vom Ektoderm abstammen. Bei geborenen Ratten, deren Muttertiere in einem bestimmten Entwicklungsstadium (Tag 14 bis 16 der Schwangerschaft) mit 6-AN behandelt wurden, traten fast immer Gaumenspalten auf, aber auch Gefäßstörungen in der Hirnanlage und Hirnmißbildungen. CHAMBERLAIN (1966) beobachtete als Erster nach 6-AN-Gabe Gaumenspalten, die merkwürdigerweise nicht auftraten, wenn er die Muttertiere hungern ließ.

Die LD 50 von 6-AN liegt bei 15 - 20 mg 6-AN/ kg Körpergewicht. MURPHY (1969) gab Muttertieren 15 mg 6-AN/kg KG am Tag 10 der Schwangerschaft. Am Tag 21 war kein lebensfähiger Embryo vorhanden. Bei Gabe von 8 mg 6-AN/ kg KG am Tag 11 bis 12 der Schwangerschaft waren am Tag 21 50% der Embryonen resorbiert und 50% lebensfähig, aber mit schweren Mißbildungen. Die Mißbildungen konnten verhütet werden, wenn kurz vor der 6-AN-Injektion der Muttertiere 100 mg/ kg KG Nicotinsäureamid gegeben wurde. Dies stimmt mit den Angaben von JOHNSON überein, der bei Versuchen mit gleichzeitiger Gabe von Tryptophyn, Nicotinsäure oder Nicotinsäureamid keine Gaumenspalten bei jungen Ratten fand.

Der DNA-Gehalt der Embryonen, deren Muttertiere 4 - 6 Stunden vor der Präparation mit 6-AN vorbehandelt wurden, war im Vergleich zu den Kontrolltieren nicht vermindert. Während dieser

Zeit wurde das Wachstum der Embryonen nicht meßbar gehemmt. Nach 26 Stunden wurde dann eine DNA-Verminderung um 30% festgestellt, die morphologisch als Wachstumsretardierung bestätigt wurde. Der Gehalt und die Bildung von Milchsäure war nach 6-AN-Gabe nach 6 Stunden vermindert.

HERKEN (1969) fand bei Versuchen mit erwachsenen Ratten, daß nach Gabe von 35 bis 70 mg/ kg KG 6-Phosphoglukonat im Gehirn angereichert wurde. Ebenfalls eine Anreicherung von 6-Phosphoglukonat fand NEUBERT et al. (1970) bei Rattenembryonen, deren Muttertiere mit 5 mg 6-AN/ kg Körpergewicht vorbehandelt wurden. Eine mögliche Erklärung für den geringeren Laktatgehalt bzw. Laktatbildung wäre die Hemmung der 6-Phosphoglukose-Isomerase (PARR, 1956).

Die 4-Stunden-Versuche zeigen noch keine ausgeprägte Hemmung der Glykolyse, da die Laktatbildung nur wenig reduziert und der Laktatgehalt sogar etwas erhöht oder gleich ist, verglichen mit den Kontrollen.

Zusammenfassung

1. Die Untersuchungen haben ergeben, daß eine Glykolyse in Anwesenheit von Sauerstoff bei intakten Rattenembryonen vom Tag 11 bis 14 der Schwangerschaft stattfinden kann.
2. Der Laktatgehalt bei Rattenembryonen ist abhängig von dem verwendeten Tierstamm. Am Tag 11 der Schwangerschaft ist der stationäre Laktatgehalt am höchsten und fällt bis zum Tag 14 auf ein Drittel ab.
3. Intakte Rattenembryonen vom Tag 11 der Schwangerschaft haben eine stärkere Laktatbildung als Embryonen vom Tag 12 bis 14 der Schwangerschaft.
4. Die Laktatbildung bei intakten Rattenembryonen ist abhängig von der Inkubationstemperatur. Sie entspricht einem Q_{10} von etwa 2 in dem untersuchten Temperaturbereich.
5. Die Laktatbildung ist abhängig von der Glukosekonzentration.
6. Bei Gabe von Cyclophosphamid zeigten Rattenembryonen vom Tag 13 der Schwangerschaft starke Wachstumsretardierungen. Die Glykolyse bleibt offenbar unbeeinflusst.
7. Die Glykolyserate bei intakten Rattenembryonen vom Tag 11 bis 13 der Schwangerschaft ist nach Vorbehandlung der Muttertiere mit 6-AN vermindert.

LITERATURVERZEICHNIS

1. BASS, R. im Symp. on:
Metabolic pathways in mammalian
embryos during organogenesis and
its modification by drugs.
(1970)
2. BROCK, N., HOHORST, H.-J.:
Metabolism of cyclophosphamide.
Cancer, 20, 900 - 904, (1967)
3. BROCK, N., DRUCKREY, H. und HERKEN, H.:
Untersuchungen über Glykolyse.
(1938)
4. BURTON, K.:
A study of the conditions and
mechanism of the reaction for
the colorimetric estimation of
deoxyribonucleic acid.
Biochemic.J., 62, (1956)
p. 315 - 323
5. CHAMBERLAIN, J.G., NELSON, M.M.:
Multiple congenital abnormalities
in the rat resulting from acute
maternal inacin deficiency during
pregnancy
PSeBM 112, 836 (1963)
6. CHAMBERLAIN, J.G.:
Effects of acute vitamin replacement
therapy during 6-aminonicotinamido
induced cleft palate late in rat
pregnancy. Presented at the 6th
Annual Teratology Society Meeting
Corpus Christi, Texas, May 25-28
(1966)
7. CHAMBERLAIN, J.G.:
Development of cleft palate induced
by 6-aminonicotinamide late in rat
gestation.
Anat. Rec., 156: 31 - 40 (1966)

8. CHAUBE, S., KORY, G., MURPHY, J.L.:
Teratogenic effects of cyclophosphamide in the rat.
cancer Chemotherapy repores 51, 6,
363 (1967)
9. COFER, H., HERKEN, H.:
Schädigung des ZNS durch Antimetaboliten des 6-AN.
Deutsche Medizinische Wochenschrift
(2025) Nr. 42, Jahrgang 33 (1963)
10. DRUCKREY, K.:
Der Stoffwechsel des geschädigten Gewebes.
Naunyn-Schmiedebergs-Arch.exp.
Phath. Pharmak. 180. 231 (1936)
11. HERKEN, H., LANGE, M.:
Blocking of pentose phosphate pathway
in the brain of rats
Naunyn-Schmiedebergs-Arch., Band 263,
496.
12. KÖHLER, E.,:
Habilitationsschrift 1970
13. KREYBIG, T., SCHMIDT, W.:
Zur chemischen Teratogenese bei der Ratte.
Arzneimittel-Forschung 16, 989 (1966)
14. MURPHY, M.L. et. al. :
Comparison of teratogenic chemicals
in the rat an chick embryos.
European J. Biochem. 10 (1969),
351 - 354 / 711

15. NEGELEIN, Erwin:
Über die glykolytische Wirkung des
embryonalen Gewebes.
Biochem. Z. 165, 122 (1925)
16. NETZLOFF, M.L., CHEPENIK, K.P., JOHNSON, E.M.,
KAPLAN, S. :
Respiration of rat embryos in culture.
Life Science 7, 401 (1968)
17. NEUBERT, D.: im Sympos. on :
Metabolic pathways in mammalian
embryos during organogenesis and
its modification by drugs.
Berlin 1970, im Druck.
18. NEW, D.A.T.:
The culture of vertebrate embryos.
Logos Press Academic Press.
19. PARR, C.W.:
Inhibition of phosphoglucose isomerase.
Nature, Volume 178, 1401, Dz. 22 (1956)
20. RAPOPORT, S.M.:
Medizin. Biochemie, 4. Auflage (1966)
21. SPIELMANN, H. im Symp. on :
Metabolic pathways in mammalian embryos
during organogenesis and its modification
by drugs.
(1970)
22. TANIMURA, T. and. SHEPARD, T.H. (with the
technical assistance of GLENDA BASS)
Glucose metabolism by rat embryos in
vitro.
(34985) (1970)

23. TIEDEMANN, H. :

Nicht-hormonale Kontrolle des Glukose-
stoffwechsels in normalen und malignen
Geweben.

Angew. Chem. 75. Jahrg., Nr. 19 (1963)

24. WARBURG, O.:

Versuche an überlebendem Carcinomgewebe.

Biochem. Z. 142, 317 (1923)

25. WARBURG, O.:

Verbesserte Methode zur Messung der
Atmung und Glykolyse.

Biochem. Z., 152, 51

26. WARBURG, O.:

Ist die ~~aerobe~~ Glykolyse spezifisch für
die Tumoren ?

Biochem. Z. 204, 483 (1928)

27. WARBURG, O.:

On respiratory inpairment in cancer
cells.

Science 124, 3215, 267 (1956)

28. WILSON, J.G.:

Teratogenic interaction of chemical
agents in the rat.

Journal of pharmacology and experi-
mental ther. 429, (1964) .

Mein Dank gilt Herrn Professor Dr.med. D. Neubert
für die Überlassung des Themas, Frau Professor
Elisabeth Köhler sowie Frau Stefanie Teske für
ihre Unterstützung und allen , die mir bei der
Durchführung der Arbeit in irgendeiner Weise
behilflich waren.

Lebenslauf

Am 1. 9. 1943 wurde ich als Tochter des Regierungsbeamten Günter Peters und dessen Ehefrau Erna geborene Pihan in Großmergthale geboren. Von 1950 - 1958 besuchte ich die Volksschulen in Oybin und Bautzen, anschließend die Erweiterte Oberschule in Bautzen, an der ich 1962 die Reifeprüfung ablegte. Nach einjähriger Lehre in der Lessing-Apotheke in Bautzen erhielt ich im August 1963 den Facharbeiterbrief für Apothekenhelferin. An diese Ausbildung schloß sich eine einjährige Praktikantenzeit an der Medizinischen Akademie "Carl Gustav Carus" in Dresden an. Im August 1964 begann ich mit dem Zahnmedizinstudium an der Friedrich-Schiller-Universität Jena. Im November 1964 flüchtete ich nach Westberlin und setzte dort mein Studium mit "Kleiner Matrikel", Fachrichtung Humanmedizin, fort. Am 28. 2. 1966 bestand ich die Prüfung zur Anerkennung des im Juli 1962 abgelegten Abiturs beim Senat für Schulwesen und konnte mit "Großer Matrikel" weiterstudieren. Im Oktober 1967 legte ich die Ärztliche Vorprüfung ab, am 5. März 1971 beendete ich das medizinische Staatsexamen und erlangte Ende März 1972 die Approbation. Am 7. Juli 1972 habe ich geheiratet.

